

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Dezember 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/138116 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 31/00 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 31/325 (2006.01) A61K 31/4965 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/055425

(22) Internationales Anmeldedatum:

1. Juni 2007 (01.06.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2006 026 464.9 1. Juni 2006 (01.06.2006) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **VIROLOGIK GMBH** [—/DE]; Innovationszentrum
Medizintechnik und Pharma, Henkestrasse 91, 91052 Er-
langen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHUBERT, Ulrich**
[DE/DE]; Fraunhoferstrasse 7, 07743 Jena (DE).

(74) Anwalt: **WEHLAN, Helmut**; **WEHLAN & WEHLAN**,
Möllendorffstrasse 49, 10367 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS AND/OR TUMOR DIS-
EASES BY INHIBITING PROTEIN FOLDING AND PROTEIN BREAKDOWN

(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR BEHANDLUNG VON VIRUSINFEKTIONEN
UND/ODER TUMORERKRANKUNGEN DURCH INHIBITION DER PROTEINFALTUNG UND DES PROTEINABBAUS

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition containing at least one proteasome inhibitor and an inhibitor
of protein folding enzymes as active components. Said substances are suitable for the treatment of acute and chronic infections with
viruses that are pathogenic to humans and animals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponenten min-
destens einen Proteasom-Inhibitor und einen Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen enthält. Diese Mittel sind zur Behandlung von
akuten und chronischen Infektionen mit für Mensch und Tier pathogenen Viren geeignet.

WO 2007/138116 A2

Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen durch Inhibition der Proteinfaltung und des Proteinabbaus.

Beschreibung

5

[0001] Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponenten mindestens einen Proteasom-Inhibitor und einen Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen enthält. Diese Mittel sind zur Behandlung von akuten und chronischen Infektionen mit für Mensch und Tier pathogenen Viren geeignet. Hierzu zählen insbesondere Erreger von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagische Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio oder Grippe. Gegenstand der Erfindung sind Mittel, die zum Einen als Wirkstoffe Inhibitoren der Proteinfaltung enthalten. Hierzu zählen Inhibitoren von zellulären Faltungsenzymen (den enzymatischen Chaperonen), wie auch Substanzen, welche die Faltung von Proteinen durch chemische Chaperone stören. Zum Anderen enthalten diese Mittel Komponenten, welche das Ubiquitin-Proteasom-System stören, insbesondere Mittel, welche das 26S Proteasom inhibieren. In Kombination dieser therapeutischen Mittel soll getrennt voneinander, oder gleichzeitig, die Effizienz der Proteinbiosynthese und der Abbau von falsch gefalteten Proteinen gestört werden. In der Summe dieser Wirkungen sollen gezielt entartete Tumorzellen und/oder akut und/oder chronisch Virus-infizierte Zellen in ihrer Vitalität beeinträchtigt, und somit in den programmierten Zelltod (Apoptose) dirigiert werden. Anwendungsgebiete sind die Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen.

25

Stand der Technik

[0002] Inhibitoren von Proteinfaltungsenzymen sind aus der Druckschrift WO 2005/063281 A2 bekannt.

30

[0003] Proteasom-Inhibitoren sind sowohl zur Behandlung von Tumorerkrankungen (z.B. US 6,083,903) als auch zur Behandlung von Virus-Infektionen beschrieben worden (WO 02/30455).

[0004] Eine Kombination aus Inhibitoren von Proteinfaltungsenzymen und Proteasom-Inhibitoren ist bisher nicht beschrieben worden. Lediglich die Kombination nicht Proteasom-

selektiver Protease-Inhibitoren mit Inhibitoren von Proteinfaltungsenzymen wurde in der Druckschrift WO 2005/063281 A2 erwähnt.

Aufgabe der Erfindung

[0005] Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen bereitzustellen.

Lösung der Aufgabe

[0006] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst. Die erfindungsgemäße Kombination aus Inhibitoren von Proteinfaltungsenzymen und Proteasom-Inhibitoren ist dem Stand der Technik überlegen. Erfindungsgemäß wurde eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponenten mindestens einen Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems und einen Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen oder eine Methode zur Beeinflussung der Proteinfaltung enthält, bereitgestellt.

[0007] Bei dem Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen handelt es sich vorzugsweise um mindestens einen Inhibitor zellulärer Chaperone oder um mindestens eine chemische Substanz, welche die Proteinfaltung direkt beeinflusst (chemisches Anti-Chaperon).

[0008] Als Methode zur Beeinflussung der Proteinfaltung dient vorzugsweise die lokale Hyperthermie.

[0009] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht darin, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche

- a) die Faltung und proteolytische Reifung von Virusproteinen hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen und dadurch die Freisetzung und die Replikation von Viren hemmen, speziell von Erregern von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagischem Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio, Herpesvirusinfektionen oder Grippe.
oder

- b) die Vermehrung von entarten Zellen, speziell Tumorzellen, stören, indem diese durch Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen in den programmierten Zelltod getrieben werden.

5 [0010] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten von molekularen Faltungsenzymen der Wirtszellen beeinflussen. Die Zellen höherer Eukaryonten nehmen diese Inhibitoren oder Substanzen auf und blockieren nach Zellaufnahme die Proteinfaltung von
10 Virusstrukturproteinen und von Proteinen aus Tumorzellen. Die Inhibitoren oder Substanzen können in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragenden Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe
15 metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

[0011] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die

- 20 a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder
b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder
c) total-synthetisch hergestellt werden oder
d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden.

25

[0012] Die Inhibitoren zellulärer Chaperone oder die chemischen Anti-Chaperone stören die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen und unterbinden dadurch die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Nachkommenviren. Außerdem regulieren, stören oder blockieren diese Substanzen
30 die Faltung von viralen Proteinen und/oder von Tumor-spezifischen Proteinen dadurch, dass die späten Prozesse der Virusreplikation wie Assemblierung, Knospung, proteolytische Reifung und Virusfreisetzung, gestört werden. Die proteolytische Prozessierung von Vorläuferproteinen der viralen Polyproteine wird dadurch gestört. Außerdem wird die Aktivität von viralen Proteasen blockiert.

35

[0013] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht darin, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten von zellulären Proteasen und/oder von Enzymen, wie zum Beispiel Ligasen, Kinasen, Hydrolasen, Glykosylierungsenzymen, Phosphatasen, DNAsen, RNAsen, Helikasen und Transferasen stören, die an der Virusreifung beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Inhibitoren zellulärer Chaperone bzw. die chemischen Anti-Chaperone besitzen ein breites Wirkspektrum und können daher als neuartige Breitbandvirostatika zur Vorbeugung und/oder zur Therapie von unterschiedlichen Virusinfektionen eingesetzt werden.

[0014] Die pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die zelluläre Chaperone wie Hitzeschockproteine (heat shock proteins (hsp)) blockieren oder hemmen, insbesondere die Aktivitäten der Hitzeschockproteine Hsp27, Hsp30, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp72, Hsp73, Hsp90, *Hsp104* und Hsc70.

[0015] Als Inhibitoren zellulärer Chaperone können Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen und deren Derivaten angehören: Geldanamycin (inhibiert Hsp90), Radicicol (Tyrosinkinase-Inhibitor; inhibiert Hsp90), Deoxyspergualin (inhibiert an Hsc70 und Hsp90), 4-PBA (4-Phenylbutyrat; Downregulation der Protein- und mRNA-Expression der Hsc70), Herbimycin A (Tyrosinkinase-Inhibitor mit Hsp72/73 Induktion), Epolactaene (Inhibitor der Hsp60), Scythe und Reaper (inhibieren Hsp70), Artemisinin (Inhibitor der Hsp90), CCT0180159 (als Pyrazole-Inhibitor von Hsp90) und SNX-2112 (Hsp90 Inhibitor), Radanamycin (Macrolidchimera von Radicicol und Geldanamycin), Novobiocin (Hsp90-Inhibitor), Quercetin (Inhibitor der Hsp70-Expression).

[0016] Als chemische Anti-Chaperone können Substanzen eingesetzt werden, welche die Proteinkonformation und die Faltung von viralen und/ oder Tumor-spezifischen Proteinen regulieren, stören oder blockieren. Dazu zählen z.B. Substanzen wie Glycerol, Trimethylamine, Betain, Trehalose oder deuteriertes Wasser (D₂O). Weiterhin können Substanzen eingesetzt werden, welche für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit unterschiedlichen humanpathogenen oder auch tierpathogenen Viren geeignet sind oder Substanzen, die für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit Erregern von chronischen Infektionserkrankungen wie AIDS (HIV-1 und HIV-2), von Hepatitis (HCV und HBV), von dem Erreger des "Severe Acute Respiratory Syndroms"

(SARS), dem SARS-CoV (Coronavirus), von Pockenviren, von Erregern des viralen hämorrhagischen Fiebers (VHF) wie den Ebola-Viren als Vertreter der Familie der Filoviridae; von Grippe-Erregern wie dem Influenza-A-Virus, geeignet sind. Dazu zählen z.B. Cyclosporin A und / oder Tacrolimus.

5

[0017] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hemmern des UPS um mindestens eine Substanz handelt, die

10

- a) speziell in Form von Proteasom-Inhibitoren die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflusst oder
- b) speziell die Wirkung von Ubiquitin-Ligasen hemmt oder
- c) speziell die Wirkung von Ubiquitin-Hydrolasen hemmt oder
- 15 d) speziell die Wirkung von Ubiquitin-aktivierenden Enzymen hemmt oder
- e) speziell die Mono-ubiquitylierung von Proteinen hemmt oder
- f) speziell die Poly-ubiquitylierung von Proteine hemmt

15

20

[0018] Die Proteasom-Inhibitoren werden von höheren Eukaryoten aufgenommen und treten nach Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung und blockieren dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms – die Trypsin-, die Chymotrypsin- und/oder die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten – innerhalb des 26S oder auch des 20S Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel.

25

[0019] Als Proteasom-Inhibitoren werden Substanzen eingesetzt, die

30

- a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden; oder
- b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen; oder
- c) total-synthetisch hergestellt werden; oder
- 30 d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden; oder
- e) durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder
- f) in Mikroorganismen hergestellt werden.

[0020] Bei den Proteasom-Inhibitoren handelt es sich um Verbindungen, die folgenden Substanzklassen angehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten; oder
- β -Lacton-Derivate; oder
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin); oder
- Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clasto lactacystein β -Lacton"

b) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:

modifizierte Peptidaldehyde wie N-carbobenzoxym-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxym-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyll-Leuzinyll-L-Leuzinyll-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxym-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);

c) Peptide, welche C-terminal eine α , β -Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinylsulfone wie Carbobenzoxym-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon (NLVS);

d) Glyoxal- oder Borsäure-Reste wie

Pyrazyl-CONH(CHPh)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂ sowie
Dipeptidyl-Borsäure-Derivate oder

e) Pinacol-Ester - wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.

[0021] Besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren sind die Epoxyketone Epoxomicin (Epoxomycin, Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und/oder Eponemycin (Eponemicin, Molekülformel: C₂₀H₃₆N₂O₅) oder Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen:

a) PS-519 als β -Lacton- sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[1S, 4R, 5S]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione - Molekülformel C₁₂H₁₉NO₄- und/oder

b) PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure - Molekülformel C₁₉H₂₅BN₄O₄ - und/oder

- c) PS-273 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder
- d) die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- 5 e) PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- f) PS-321 als (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); - und/oder
- g) PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- h) die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-*homo*-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- 10 i) PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- j) PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH-*p*F-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) eingesetzt werden.

15 **[0022]** Die beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzungen eignen sich als Arzneimittel oder zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen. Eine Kombination mit anderen Mitteln, die zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen ist ebenfalls möglich.

20 **[0023]** Die erfindungsgemäße Verwendung dieser Mittel erfolgt in Form von

- Inhalaten
- Depotformen
- Pflaster
- 25 - in mikroelektronischen Systemen („intelligente Pille“)

[0024] Eine Verwendung in der Onkologie und / oder Onkologie und Virologie zur Behandlung von

- - Glioblastom (Maligne Hirntumore)
- 30 - - Mamma-CA (CA = Carcinom)
- - Kopf-, Hals-CA
- - Plattenepithel-CA
- - Ovarial-CA
- - Bronchial-CA (kleinzellig, großzellig)
- 35 - - Schilddrüsen-CA

- - Lungen-CA
- - Kolon-CA
- - Pankreas-CA
- - Leukemie (AML, ALL, CML, CLL)
- 5 - - akute myeloische, chronische
- - acute lymphatische, chronische
- - Lymphom (Non-Hodgkin)
- - Zervix-Ca
- - Neuroblastom
- 10 - - Haut-CA (Melanom)
- - Prostata-CA
- - Blasen-CA
- - Sarkome (Knochen u. Weichteile)
- - Zwerchfell-CA
- 15 - - Gastrointestinale-CA (z. B. Magen, Oesophagus)
- - Hoden-Ca
- - Metastasen (z. B. Knochenmark)
- - Lymphoma-Viren
- - Herpes Simplex
- 20 - - Zytomegalie
- - Varizellen
- - Varicella Zoster
- - Masern
- - Lassa-Fieber
- 25 - - Aids
- - Mumps (- Meningitis, - Orchitis)
- - Enteritis ; Grippe (alle Formen)
- - Enzephalitis
- - Hepatitis (A, B, C, D, E, G)
- 30 - - Röteln
- - Coxsackie B
- - Polio (-Myelitis)
- - Enzephalomyelitis
- - Pankreatitis
- 35 - - Pneumonie
- - Myokarditis

- - Tropenkrankheiten (Virale)
- - alle doppel- und einsträngigen DNS und RNS humanpathogenen Viren

ist möglich.

5 **[0025]** Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass durch die Störung der Mechanismen der Proteinfaltung verstärkt fehlgefaltete Proteine gebildet werden. Diese Fehlprodukte der Proteinbiosynthese werden normalerweise durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut und somit aus dem Zellstoffwechsel entfernt. Bei Inhibition des UPS, zum Beispiel durch Proteasom-Inhibitoren und/oder durch Inhibitoren von Ubiquitin-Ligasen, werden diese,
10 in der Regel poly-ubiquitinylierten und falsch gefalteten Fehlprodukte der Proteinbiosynthese in der Zelle akkumulieren und dadurch vielfältige Störungen des Zellstoffwechsel auslösen, welche in der Summe der Wirkungen die betreffende Zelle bevorzugt in den programmierten Zelltod (Apoptose) treiben wird. Da sowohl in Virus-infizierten, als auch in sich rasch teilenden Tumorzellen eine besonders hohe Rate der Proteinbiosynthese vorliegt, werden
15 insbesondere solche Zellen verstärkt auf die Wirkung von Inhibitoren des UPS und der Proteinfaltung reagieren, während normale und gesunde Zellen von diesen Inhibitoren weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Darauf beruht der grundsätzliche Wirkmechanismus des erfindungsgemäß vorgeschlagenen neuen Therapieverfahrens.

20 **[0026]** In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird die Wirkung dieser Inhibitoren zur Behandlung von Plasmazytomzellen von Patienten mit Multiplen Myelom benutzt. Diese B-Zelltumore zeichnen sich durch eine extrem hohe Synthese-Rate an Immunglobulinen aus. Bekanntermaßen sind diese Plasmazytomzellen besonders sensitiv gegenüber der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren. Daher werden Proteasom-Inhibitoren,
25 insbesondere in Form von Borsäure-Peptiden (Handelsname Velcade) erfolgreich für die Behandlung von Multiplen Myelom eingesetzt. Allerdings muss bei der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren ein sehr enges therapeutisches Fenster berücksichtigt werden, da die Grenze zwischen der therapeutischen Dosis und der tolerierbaren toxischen Dosis sehr eng ist. Durch die Behandlung mit Inhibitoren der Proteinfaltung werden solche Plasmazytomzellen
30 für die Wirkung auf Proteasom-Inhibitoren sensibilisiert. Durch die Kombination von Proteasom-Inhibitoren und Inhibitoren der Proteinfaltung wird die Wirkung beider Wirkstoffe in synergistischer Weise verstärkt. Gleichzeitig können beide Medikamente in sub-toxischen Dosen mit höherer Wirksamkeit eingesetzt werden, was in der Summe die Erfolgsaussichten der Therapie wesentlich erhöht.

[0027] Die erfindungsgemäße Lösung bietet gegenüber dem Stand der Technik folgende Vorteile:

- Vermeidung von Resistenzen
- 5 - Heilung bestimmter Krankheiten
- Höhere Responderrate
- Behandlung mehrerer Tumorformen (Leichte, mittlere, schwere Fälle)

[0028] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die anti-virale Wirkung in der Kombination beider Wirkstoffe. Es ist bekannt, dass Proteasom-Inhibitoren die Replikation von humanen Immundefizienzviren (HIV) und anderen Viren stört, indem es die Akkumulation von falsch gefalteten Gag-Proteinen induziert, welche mit den geordneten Prozessen der Assemblierung und Freisetzung von Nachkommenviren interferiert. Diese therapeutische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren wird wesentlich verstärkt, wenn die virusinfizierte Zelle gleichzeitig mit Inhibitoren der Proteinfaltung behandelt wird. Dadurch erhöht sich die Zahl an falsch gefalteten Strukturproteinen des Virus, welche in einem *trans*-negativen Mechanismus, sozusagen in einer Prion-ähnlichen Wirkungsweise, verstärkt die Assemblierung von Virusproteinen und dadurch die Formierung von Nachkommenviren stören wird. Diese Ausführungsform der Erfindung ist für alle Virusinfektionen, bei denen ein geordneter Zusammenbau von neu synthetisierten Virusstrukturproteinen stattfindet, allgemein gültig.

[0029] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie auf diese Beispiele zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Der Hsp90-Inhibitor 17-AAG zeigt bis zu einer Konzentration von 10nM keine Zyto-Toxizität in CEM-Zellen.

[0030] CD4⁺-T-lymphatische Zellen (CEM-Zellen) wurden in einer 96-well-Platte in einer Dichte von 1×10^4 Zellen je 100µl ausgesät. Zum Medium (siehe Beispiel 4a) wurden zuvor entsprechende Mengen 17-AAG gegeben, um Endkonzentrationen von 1µM; 100nM; 10nM; 1nM; 0.1nM und 0.01nM 17-AAG zu erreichen. Nach 30-stündiger Inkubation bei 37°C und

5% CO₂ wurden 10µl AlamarBlue™ (Invitrogen) zugegeben und alle Ansätze für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Maß für die Vitalität der CEM-Zellen (angegeben in MTT CEM) unter 17-AAG Einfluss konnte durch die Messung des Farbumschlages des Mediums mittels Fluoreszenzmessung bei 530/590nm bestimmt werden. Alle Ansätze erfolgten in
5 Triplikat.

Beispiel 2: pNLenv1-transfizierte HeLaSS6-Zellen zeigen unter 17-AAG-Einfluß in der Virusfraktion eine verminderte Gag-Prozessierung und eine verstärkte Hsp70-Expression in der Zellfraktion.

10
[0031] Zur biochemischen Analyse des Einflusses von 17-AAG auf die Kinetik der Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung wurden Zeitkinetiken durchgeführt. Die experimentellen Details der Kultivierung, Transfektion, Medienwechsel und der Zeitkinetik sind in Beispiel 4a/b angegeben. Hierzu wurden Kulturen von HeLaSS6-Zellen eingesetzt, welche mit
15 pNLenv1 (Schubert *et al*, 1995) transfiziert wurden. Nach Inkubation in 17-AAG-haltigem Medium (100nM 17-AAG), bzw. Inhibitor-freiem Medium, wurde die Kinetik nach distinkten Waschschritten und Aliquotierung der Ansätze begonnen. Aliquote Zellkulturen wurden zu jedem Zeitpunkt gewonnen und durch Zentrifugation in Zell-, Virus- und Zellkulturüberstand-Fractionen aufgetrennt. Die HIV-Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-
20 Membran transferiert und anschließend durch Antikörper-vermittelte Chemoluminiszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

Beispiel 3: 17-AAG, als auch die Kombination mit PS341, hemmt die Virusreplikation von X4-trophen HI-Viren im HLAC-Modell.

25
[0032] Humane Tonsillen wurden mazeriert und in 96-well Platten überführt. Nach eintägiger Inkubation wurden die Zellen mit X4-trophen HI-Viren infiziert, mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt und tags darauf gewaschen. Diese Schritte, wie auch die Folgenden, sind unter Beispiel 4c-d im Detail beschrieben. Zu jedem Kinetikpunkt wurden 150µl des Mediums
30 entfernt und bei -80°C zur RT-Messung aufbewahrt. Das wieder zugegeben Medium enthielt die für den speziellen Ansatz nötigen Konzentrationen an Inhibitoren.

[0033] Nach 15 Tagen wurde der Anteil funktioneller gebildeter HI-Viren mittels RT-Assays (siehe Beispiel 4e) aus den aufbewahrten Überständen ermittelt.

Beispiel 4: Material und MethodenBeispiel 4a: Zellkultur

[0034] CEM-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% (V/V) fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin kultiviert.

[0035] Hela-Zellen (ATCC CCL2) wurden in Dulbeccos' modifizierten Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U ml⁻¹ Penicillin, und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

[0036] Tonsilläre Zellen wurden in RPMI 1640 mit 15% (V/V) fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U ml⁻¹ Penicillin, 100 µg ml⁻¹ Streptomycin, 2.5µg/ml Fungizone, 1mM Sodiumpyrovate, 1% MEM Non-Essential Aminosäure-Lösung und 50µg/ml Gentanamycin kultiviert („Tonsillenmedium“).

Beispiel 4b: Transfektion, Medienwechsel und Kinetik

[0037] Hela-Zellen (ATCC CCL2) wurden mittels pNLΔenv-Lipofectamine2000 Gemisch in OPTI-MEM transfiziert. Nach 8-stündiger Inkubation in 37°C und 5% CO₂ wurde ein Medienwechsel vollzogen. Bei einem der beiden Ansätze wurde dem Medium eine Endkonzentration von 100nM 17-AAG zugegeben und für weitere 16 Stunden inkubiert. Nach distinkten Waschschritten in PBS wurden die entsprechenden Zeitpunkte aliquotiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min; 5000rpm) vom Überstand getrennt und später mittels CHAPS/DOC-Lyse (3min auf Eis) lysiert. Die VLP's im Überstand wurden über ein 20%-iges Sucrose-Kissen pelletiert (90min; 14000rpm), und wie auch die Lysate der Zellpellets mittels 10%-iger SDS-PAGE aufgetrennt, per Nass-Blot auf PVDF-Membran überführt und in 10%-igem Milchpulver (in PBS-Tween 0.1%) geblockt. Die Detektion der HIV- bzw. Zell-spezifischen Proteine erfolgte über spezifische Antikörper (gegen Hsp70; Hsp90; p24; PR55; β-Aktin). Durch die Reaktion mit Sekundärantikörpern und deren gekoppelter Chemolumineszenz konnten die Signale auf Röntgenfilmen detektiert werden.

Beispiel 4c: Transfektion und Gewinnung von Virusstocks

[0038] Für die Herstellung von Virus-Präparaten wurde Plasmid-DNA von molekularer HIV-1-DNA unter Anwendung der Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode in HeLa-Zellen transfiziert. Dazu wurden konfluente Kulturen von Hela-Zellen (5x10⁶ Zellen) mit 25-µg Plasmid DNA in Kalziumphosphat-Kristallen, hergestellt nach einer Methode von Graham und

van der Eb (1973), inkubiert und anschließend einem Glycerol-Schock nach Gorman et al. (1982) unterzogen. Für die Gewinnung von konzentrierten Viruspräparaten wurden zwei Tage nach Transfektion die Zellkulturüberstände geerntet. Anschließend wurden die Zellen sowie deren Bestandteile durch Zentrifugation (1,000 x g, 5 min, 4°C) und Filtration (0.45 µm Porengröße) abgetrennt. Viruspartikel wurden durch Ultra-Zentrifugation (Beckman SW55 Rotor, 1.5 hr, 35,000 rpm, 10°C) pelletiert und nachfolgend in 1 ml of DMEM Medium resuspendiert. Die Viruspräparate wurden durch Filtration sterilisiert (0.45 µm Porengröße) und portioniert eingefroren (-80°C). Einzelne Viruspräparate wurden durch Bestimmung der Reverse Transkriptase-Aktivität, und zwar anhand eines bereits beschriebenen Tests (Willey *et al.*, 1988), unter Verwendung von [³²P]-TTP Einbau in ein oligo(dT)-poly(A) Template standardisiert.

Beispiel 4d: HLAC-Modell (Gewinnung; Infektion; Kinetik)

[0039] Das Tonsillengewebe wurde in PBS gewaschen, mittels Skalpell von Blutgerinnseln gesäubert und in 1-2mm² große Stücke zerteilt. Einzelne Zellen wurden durch mechanische Pressung durch ein Filternetz erzielt. Nach erfolgter Zentrifugation der vereinzelter Zellen (5min, 1200rpm) wurden die Zellen gezählt, in 96-well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Infektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10ng X4-tropher HIV-Stocks bei gleichzeitiger Applikation der entsprechenden Inhibitorkonzentrationen. Am folgenden Tag wurden 50µl Überstand entnommen („1dpi“) und bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen wurden daraufhin zentrifugiert (5min; 1200rpm) und weitere 50µl Überstand entfernt. Nach Resuspension der Zellen in 100µl Tonsillenmediums wurde dieser Waschschritt zweifach wiederholt. Nach Zugabe von Tonsillen-Medium mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen wurden die Zellen erneut bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. An den Tagen 3, 6, 9 und 12 wurden 150µl Medium entnommen, bei -80°C aufbewahrt und 150µl Medium mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen zugegeben. An Tag 15 wurden lediglich 150µl Überstand abgenommen, bei -80°C aufbewahrt und die Zellen danach entsorgt.

Beispiel 4e: RT-Assay

[0040] Die bei -80°C aufbewahrten Tonsillenüberstände wurden durch Bestimmung der Reverse Transkriptase-Aktivität, und zwar anhand eines bereits beschriebenen Tests (Willey *et al.*, 1988), unter Verwendung von [³²P]-TTP Einbau in ein oligo(dT)-poly(A) Template, ermittelt.

Legende zu den Figuren

Figur 1:

[0041] Der Hsp90-Inhibitor 17-AAG zeigt bis zu einer Konzentration von 10nM keine Zytotoxizität in CEM-Zellen. CD4⁺-T-lymphatische Zellen (CEM-Zellen) wurden mit verschiedenen Konzentrationen 17-AAG inkubiert und der zeitabhängige Farbumschlag, gleichbedeutend mit der Anzahl lebender Zellen, nach AlamarBlueTM (Invitrogen)-Zugabe mittels Fluoreszenzmessung ermittelt.

Figur 2:

[0042] HeLaSS6-Zellen transfiziert mit subgenomischem HIV-1 Expressionsvektor pNLenv1 zeigen unter 17-AAG-Einfluß in der Virusfraktion eine verminderte Gag-Prozessierung und eine verstärkte Hsp70-Expression in der Zellfraktion.

Figur 3:

[0043] Antiviraler Effekt von 17-AAG allein, als auch in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor PS341, gegen X4-trophe HI-Viren im HLAC-Modell, dargestellt anhand der RT-Daten der jeweiligen Kinetikpunkte zweier unterschiedlicher Tonsillen (A und B).

[0044] Die Virusreplikation des X4-tropen HI-Viruses konnte in Tonsille A (A) weder durch Inkubation mit 1nM Proteasom-Inhibitor PS341, 1nM 17-AAG noch mittels 10nM 17-AAG deutlich beeinflusst werden. Erst die Kombination beider Substanzen (5nM PS341 und 1nM 17-AAG) erreichte eine deutliche Abnahme der Virusreplikation. Hierbei zeigte sich, dass dieser additive Effekt bei Applikation beider Substanzen durch eine höhere Konzentration des Hsp90-Inhibitors 17-AAG (10nM) noch verstärkt werden konnte. Die Tonsille B (B) zeigte ebenfalls keine Beeinflussung der X4-tropen HIV-Replikation bei Inkubation mit 1nM PS341 oder 1nM 17-AAG. Im Gegensatz zu Tonsille A konnte bei Tonsille B bereits bei Zugabe von 10nM 17-AAG eine deutliche Reduktion der Virusreplikation nachgewiesen werden. Bei jeglicher Kombination zwischen Proteasom-Inhibitor PS341 mit Hsp90-Inhibitor 17-AAG konnte keinerlei Virusreplikation mehr nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponenten mindestens einen Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems und einen Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen.
5
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Inhibitor von Proteinfaltungsenzymen mindestens um einen Inhibitor zellulärer Chaperone oder um mindestens eine chemische Substanz handelt, welche die Proteinfaltung direkt beeinflusst (chemisches Anti-Chaperon)handelt.
10
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche
15
 - a) die Faltung und proteolytische Reifung von Virusproteinen hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen und dadurch die Freisetzung und die Replikation von Viren hemmen, speziell von Erregern von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagischem Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio, Herpesvirusinfektionen oder Grippe.
20
 - oder
 - b) die Vermehrung von entarten Zellen, speziell Tumorzellen, stören, indem diese durch Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen in den programmierten Zelltod getrieben werden.
- 25 4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten von molekularen Faltungsenzymen der Wirtszellen beeinflussen.
- 30 5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die von Zellen höherer Eukaryonten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme die Proteinfaltung von Virusstrukturproteinen und von Proteinen aus Tumorzellen blockieren.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragenden Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die
- a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder
 - b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder
 - c) total-synthetisch hergestellt werden oder
 - d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen stören und dadurch die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Nachkommenviren unterbinden.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Faltung von viralen Proteinen und/oder von Tumor-spezifischen Proteinen regulieren, stören oder blockieren.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die späte Prozessen der Virusreplikation wie Assemblierung, Knospung, proteolytische Reifung und Virusfreisetzung stören.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die proteolytische Prozessierung von Vorläuferproteinen der viralen Polyproteine stören.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivität von viralen Proteasen blockieren.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten von zellulären Proteasen und/oder von Enzymen, wie zum Beispiel Ligasen, Kinasen, Hydrolasen, Glykosylierungsenzymen, Phosphatasen, DNAsen, RNAsen, Helikasen und Transferasen stören, die an der Virusreifung beteiligt sind.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche ein breites Wirkspektrum besitzen und daher als neuartige Breitbandvirostatika zur Vorbeugung und/oder zur Therapie von unterschiedlichen Virusinfektionen eingesetzt werden.
15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die zelluläre Chaperone wie Hitzeschockproteine (heat shock proteins (hsp)) blockieren.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten der Hitzeschockproteine Hsp27, Hsp30, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp72, Hsp73, Hsp90, Hsp104 und Hsc70 hemmen.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen und deren Derivaten angehören: Geldanamycin (inhibiert Hsp90), Radicicol (Tyrosinkinase-Inhibitor; inhibiert Hsp90), Deoxyspergualin (inhibiert an Hsc70 und Hsp90), 4-PBA (4-Phenylbutyrat; Downregulation der Protein- und mRNA-Expression der Hsc70), Herbimycin A (Tyrosinkinase-Inhibitor mit Hsp72/73 Induktion), Epolactaene (Inhibitor der Hsp60), Scythe und Reaper (inhibieren Hsp70), Artemisinin (Inhibitor der Hsp90), CCT0180159 (als Pyrazole-Inhibitor von Hsp90) und SNX-2112 (Hsp90 Inhibitor), Radanamycin (Macrolidchimera von Radicicol und Geldanamycin), Novobiocin (Hsp90-Inhibitor), Quercetin (Inhibitor der Hsp70-Expression).
18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Anti-Chaperone Substanzen eingesetzt werden, welche die Proteinkonformation und die Faltung von viralen und/oder Tumor-spezifischen Proteinen regulieren, stören oder blockieren.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Anti-Chaperone Substanzen wie Glycerol, Trimethylamine, Betain, Trehalose oder deuteriertes Wasser (D₂O) eingesetzt werden.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Anti-Chaperone Substanzen eingesetzt werden, welche für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit unterschiedlichen humanpathogenen oder auch tierpathogenen Viren geeignet sind.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren von molekularen Chaperonen oder von chemischen Anti-Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit Erregern von chronischen Infektionserkrankungen wie AIDS (HIV-1 und HIV-2), von Hepatitis (HCV und HBV), von dem Erreger des "Severe Acute Respiratory Syndroms" (SARS), dem SARS-CoV (Coronavirus), von Pockenviren, von Erregern des viralen hämorrhagischen Fiebers (VHF) wie den Ebola-Viren als

Vertreter der Familie der Filoviridae; von Grippe-Erregern wie dem Influenza-A-Virus, geeignet sind.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass Cyclosporin A und / oder Tacrolimus eingesetzt werden.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hemmern des UPS um mindestens eine Substanz handelt, die

a) speziell in Form von Proteasom-Inhibitoren die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflusst oder

b) speziell die Wirkung von Ubiquitin-Ligasen hemmt oder

c) speziell die Wirkung von Ubiquitin-Hydrolasen hemmt oder

d) speziell die Wirkung von Ubiquitin-aktivierenden Enzymen hemmt oder

e) speziell die Mono-ubiquitinylierung von Proteinen hemmt oder

f) speziell die Poly-ubiquitinylierung von Proteine hemmt.

24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass Substanzen eingesetzt werden, die als Proteasom-Inhibitoren von höheren Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms – die Trypsin-, die Chymotrypsin- und/oder die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten – innerhalb des 26S oder auch des 20S Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.

25. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die

g) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden; oder

h) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen; oder

i) total-synthetisch hergestellt werden; oder

j) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden; oder

k) durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder

l) in Mikroorganismen hergestellt werden.

26. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen angehören:

f) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten; oder
- β -Lacton-Derivate; oder
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin); oder
- Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clasto lactacystein β -Lacton"

g) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:

modifizierte Peptidaldehyde wie N-carbobenzoxym-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxym-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyll-Leuzinyll-L-Leuzinyll-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxym-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);

h) Peptide, welche C-terminal eine α , β -Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinylsulfone wie Carbobenzoxym-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon (NLVS);

i) Glyoxal- oder Borsäure-Reste wie

Pyrazyl-CONH(CHPh)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂) sowie
Dipeptidyl-Borsäure-Derivate oder

j) Pinacol-Ester - wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.

27. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren die Epoxyketone Epoxomicin (Epoxomycin, Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und/oder Eponemycin (Eponemicin, Molekülformel: C₂₀H₃₆N₂O₅) eingesetzt werden.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen

5 k) PS-519 als β -Lacton- sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione - Molekülformel $C_{12}H_{19}NO_4$ - und/oder

l) PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure - Molekülformel $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ - und/oder

10 m) PS-273 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder

n) die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Napthyl)-CONH(-CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

o) PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

15 p) PS-321 als (Morpholin-CONH-(CH-Napthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); - und/oder

q) PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

r) die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-*homo*-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

20 s) PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

t) PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH_pF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂)

eingesetzt werden.

25 29. Mittel zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen die eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 enthalten.

30. Verwendung der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen.

30 31. Verwendung der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen.

32. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31 in Kombination mit anderen Mitteln, die zur Behandlung von Virusinfektionen und / oder Tumorerkrankungen eingesetzt werden.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 32 in Form von

- Inhalaten
- Depotformen
- 5 - Pflaster
- in mikroelektronischen Systemen („intelligente Pille“)

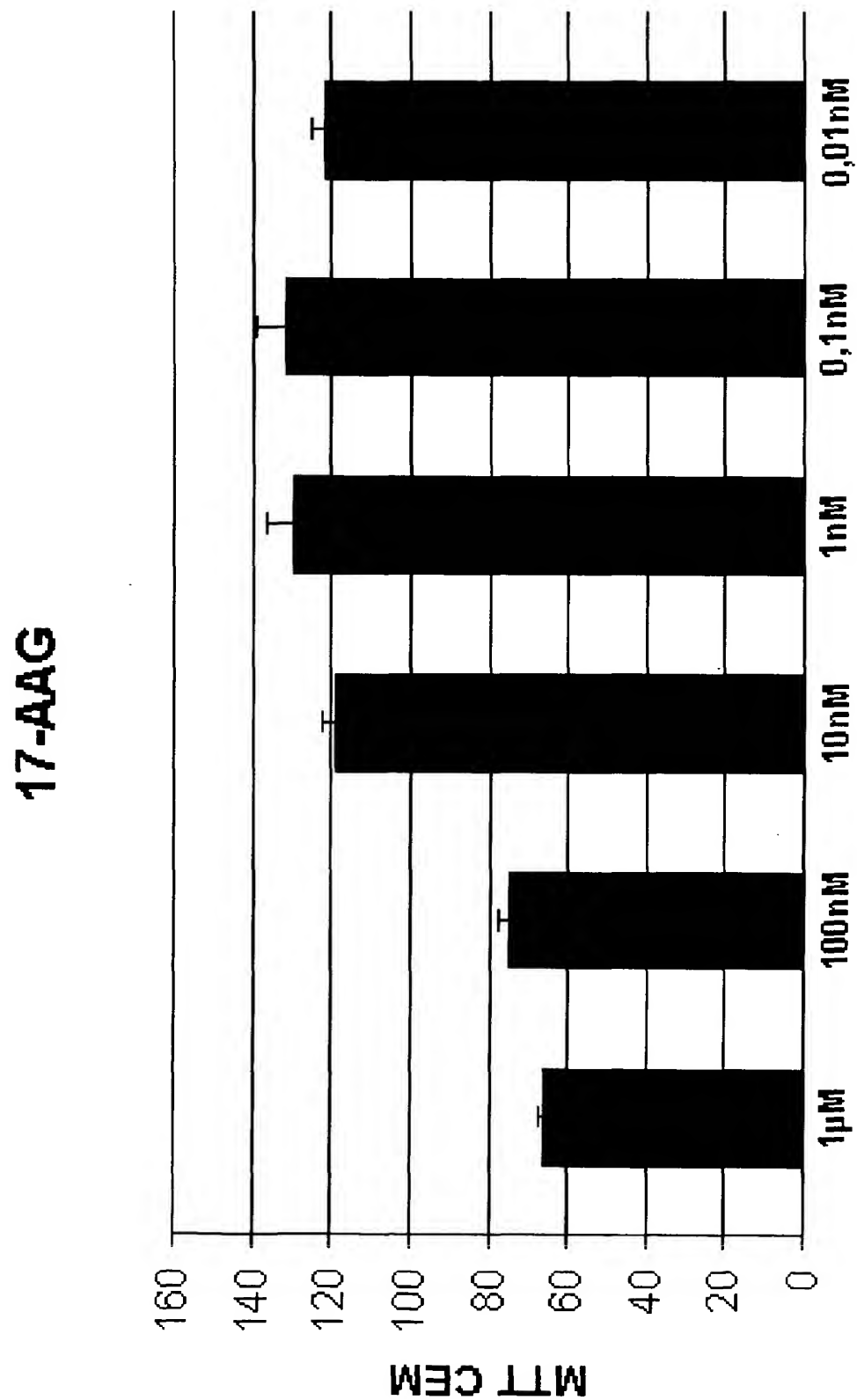
34. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 33 in der Onkologie und / oder Onkologie und Virologie

10 35. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31 zur Behandlung von:

- - Glioblastom (Maligne Hirntumore)
- - Mamma-CA (CA = Carcinom)
- - Kopf-, Hals-CA
- 15 - - Plattenepithel-CA
- - Ovarial-CA
- - Bronchial-CA (kleinzellig, großzellig)
- - Schilddrüsen-CA
- - Lungen-CA
- 20 - - Kolon-CA
- - Pankreas-CA
- - Leukemie (AML, ALL, CML, CLL)
- - akute myeloische, chronische
- - acute lymphatische, chronische
- 25 - - Lymphom (Non-Hodgkin)
- - Zervix-Ca
- - Neuroblastom
- - Haut-CA (Melanom)
- - Prostata-CA
- 30 - - Blasen-CA
- - Sarkome (Knochen u. Weichteile)
- - Zwerchfell-CA
- - Gastrointestinale-CA (z. B. Magen, Oesophagus)
- - Hoden-Ca
- 35 - - Metastasen (z. B. Knochenmark)
- - Lymphoma-Viren

- - Herpes Simplex
- - Zytomegalie
- - Varizellen
- - Varicella Zoster
- 5 - - Masern
- - Lassa-Fieber
- - Aids
- - Mumps (- Meningitis, - Orchitis)
- - Enteritis ; Grippe (alle Formen)
- 10 - - Enzephalitis
- - Hepatitis (A, B, C, D, E, G)
- - Röteln
- - Cocksackie B
- - Polio (-Myelitis)
- 15 - - Enzephalomyelitis
- - Pankreatitis
- - Pneumonie
- - Myokarditis
- - Tropenkrankheiten (Virale)
- 20 - - alle doppel- und einsträngigen DNS und RNS humanpathogenen Viren.

Figur 1



Figur 2

